

加热调控的溶瘤腺病毒载体构建及其特征研究*

韦芳¹⁾ 王慧萍¹⁾ 陈霞芳¹⁾ 李川源²⁾ 黄倩^{1)**}

¹⁾上海交通大学附属第一人民医院中心实验室, 上海 200080;

²⁾ Department of Radiation Oncology, University of Colorado Health Sciences Center, Aurora, Colorado 80111, USA)

摘要 溶瘤腺病毒作为近年来新兴的肿瘤基因治疗策略, 因具有“细胞溶解”和“旁观者效应”而备受关注. 构建了受热休克蛋白 70(heat shock protein 70, HSP70)基因启动子调控的溶瘤腺病毒载体 Ad-HSP70p-E1A, 观察该病毒与热疗联合应用对肺癌细胞生长的抑制作用和带动治疗基因在肺癌细胞中表达的效果. 体外实验结果表明, Ad-HSP70p-E1A 在肺癌细胞株 A549 内能较好地实现自身复制, 并产生一定的溶瘤作用, 在联合热疗后, Ad-HSP70p-E1A 的自身复制能力和溶瘤效果分别增强了 2~10 倍和 5 倍以上. 此外, Ad-HSP70p-E1A 还可通过反式提供 E1A 蛋白而使 10 moi 用量的复制缺陷型腺病毒 AdGFP、Ad-CMV-hGMCSF 和 Ad-CMV-mIL12 的表达提升 76.64 倍、5 倍和 7 倍.

关键词 溶瘤腺病毒, HSP70 启动子, 热疗, 基因治疗, 肺癌
学科分类号 Q78, R73

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00308

目前, 肺癌的发病率和死亡率在全球范围内已迅速跃升至首位. 由于绝大多数肺癌患者在确诊时已属晚期, 仅能接受化疗或放疗, 且治疗效果非常差^[1]. 基因治疗作为一种新兴的治疗手段, 被期望能在晚期癌症的治疗中发挥一定作用. 本研究以肺癌细胞作为研究对象, 探讨基因治疗与热疗结合治疗恶性肿瘤, 特别是肺癌的新治疗策略. 为此, 我们构建了受热休克蛋白 70 基因启动子(HSP70)调控的溶瘤腺病毒载体 Ad-HSP70p-E1A, 观察联合热疗后病毒的复制能力和溶瘤效果, 以及利用复制型腺病毒带动携带治疗基因的非复制型腺病毒复制, 以增强基因治疗的效果, 为恶性肿瘤特别是肺癌的治疗提供新的思路 and 工具.

1 材料与方法

1.1 材料

腺病毒 E1 区转化的人胚胎肾细胞株 AD-293 购于 Stratagene 公司、人肺癌细胞株 A549 购于中国科学院上海生物化学和细胞生物学研究所, 胎牛血清购自 Gibco BRL 公司. AD-293 细胞株和 A549 细胞株分别在 10%胎牛血清 DMEM 和 10%胎牛血清 DMEM/F12 中培养. 质粒 pEGFP-1-HSP70 promoter、pNGVL3-mIL12 和 pNGVL1-hGMCSF 由杜克大学李川源教授惠赠^[2], 质粒 pENTRTM 1A、

pAd/PL-DESTTM 购自 Invitrogen 公司, pShuttle-CMV、pAdEASY-1、BJ5183 菌种购自 Stratagene 公司, 均由上海交通大学附属第一人民医院保存. 转染试剂 Lipofectamine 2000、TRIZOL 购自 Invitrogen 公司, 反转录试剂盒 Reverse Transcription System 购自 Promega 公司, 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、引物合成、SYBR[®] Premix Ex TaqTM 购自 TAKARA 公司, 质粒抽提纯化试剂盒购自 Qiagen 公司, SeaplaqueTM Agarose low melting temperature agarose 购自 Cambrex Bio Science Rockland 公司, CCK-8 assay Kit 购自 DOJINDO 公司, mIL12 和 hGMCSF ELISA Kit 购自上海森雄科技有限公司 (R&D 进口分装). 野生型腺病毒 DL309 和复制缺陷型 AdGFP 为上海交通大学附属第一人民医院保存.

1.2 方法

1.2.1 腺病毒穿梭载体.

pENTRTM 1A-HSP70p-E1A、pShuttle-CMV-

* 国家自然科学基金资助项目(杰出青年项目 30325043, 海外杰青项目 30428015, 面上项目 30500553, 30672440)和国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2004CB518804).

** 通讯联系人.

Tel: 021-63240090-4601, E-mail: qhuang@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2009-05-10, 接受日期: 2009-08-05

hGMCSF、pShuttle-CMV-mIL12 的构建, 包装和扩增. 参照 Ad5 型的基因组序列, 设计全长 E1A 基因的合成引物序列, 上游引物为 *cgcgatccgcgatgagacatatctgcca* (含 *Bam*H I 酶切位点), 下游引物为 *ataagaatgcggccgctaaattatggcctggggcggttac* (含 *Not* I 酶切位点), 以人胚胎肾细胞株 AD-293 基因组 DNA 为模板, 用 *pfu* 酶扩增 E1A 基因. 用 *Bam*H I + *Not* I 双酶切 PCR 扩增的 E1A 产物和 pEGFP-1-HSP70 promoter (长约 400 bp, 含 GenBank accession. AF093759 hsp70B 基因上游 promoter 区 -226 ~ -7 位点片段序列和一段 HSP RNA leader 序列), 回收 E1A 片段插入 pEGFP-1-HSP70 promoter 的大片段中, 得到 pEGFP-1-HSP70p-E1A; 用 *Afl* II 酶切 pEGFP-1-HSP70p-E1A 并补齐, 再用 *Bgl* II 酶切, 回收含 HSP70p-E1A 完整表达框片段, 将该片段插入经 *Bam*H I + *Eco*R V 双酶切的 pENTR™ 1A 中, 得到 pENTR™ 1A-HSP70p-E1A (图 1a). 参照 ViraPower Adenoviral™ Expression System, 用 LR clonase™ enzyme 将 pENTR™ 1A-HSP70p-E1A 和 pAd/PL-DEST™ 做 LR 体外重组, 挑取并鉴定阳性克隆, 得到 pAd/PL-DEST™-HSP70p-E1A; 将 2 μg 的纯

化 pAd/PL-DEST™-HSP70p-E1A 经 *Pac* I 酶切后, 用 Lipofectamine 2000 转染入早代 AD-293 细胞中, 大约 10 天后产生腺病毒 Ad-HSP70p-E1A, 收集细胞和上清.

用 *Bam*H I 分别酶切 pNGVL1-hGMCSF 和 pNGVL3-mIL12, 分别补齐后再分别用 *Sal* I 酶切, 各自回收含 hGMCSF 基因和 mIL12 基因片段, 将 2 个片段分别插入经 *Sal* I + *Eco*R V 双酶切的 pShuttle-CMV 载体中, 得到穿梭质粒 pShuttle-CMV-hGMCSF 和 pShuttle-CMV-mIL12 (图 1b). 参照 AdEasy™ Adenoviral Vector System 系统操作方法^[3], 获得阳性同源重组质粒 Ad-CMV-hGMCSF 和 Ad-CMV-mIL12, 经 *Pac* I 酶切鉴定后, 用 Lipofectamine 2000 转染入早代 AD-293 细胞中, 大约 10 天后产生腺病毒 Ad-CMV-hGMCSF 和 Ad-CMV-mIL12, 收集细胞和上清.

取第一代腺病毒液经 3 次反复冻融后, 感染一盘直径 10 cm 生长至 80%~90% 密度的 AD-293 细胞, 37℃ 感染 2~3 天后收集细胞和上清, 再经反复冻融后获得第二代病毒液. 按照该方法扩增 3~4 轮, 收获大量腺病毒以备后续实验.

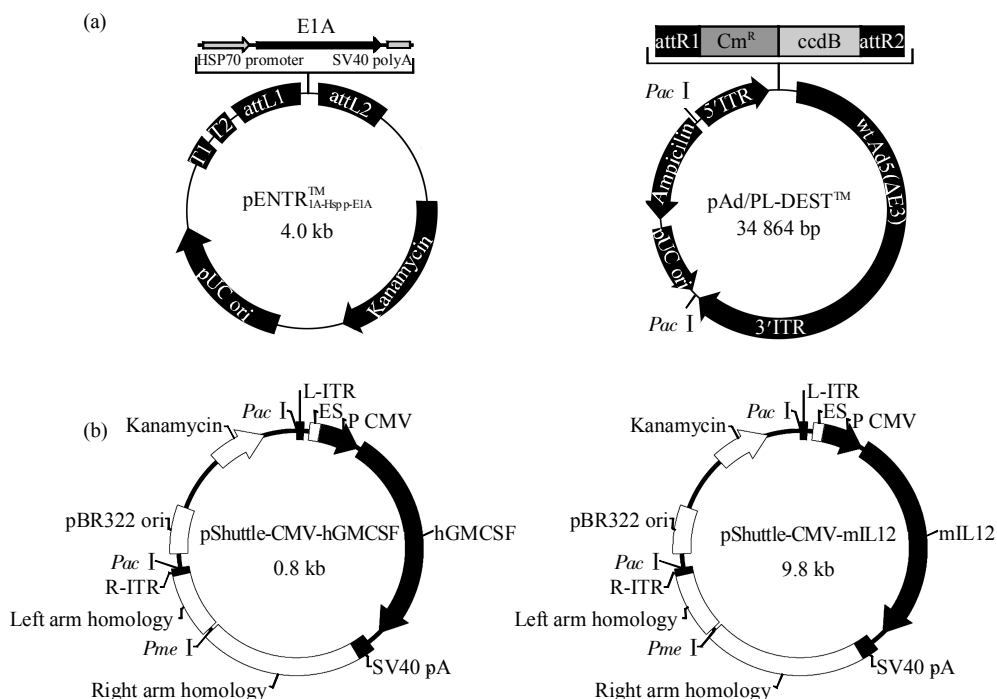


Fig. 1 Construction of the adenoviral shuttle vector

(a) The maps of adenoviral entry vector pENTR™ 1A-HSP70p-E1A (left) and adenoviral framework vector pAd/PL-DEST™ (right) in ViraPower Adenoviral™ Expression System. (b) The maps of adenoviral shuttle vector pShuttle-CMV-hGMCSF (left) and pShuttle-CMV-mIL12 (right) in AdEasy™ Adenoviral Vector System.

1.2.2 腺病毒滴度测定. 采用病毒空斑单位法 (plaque forming unit, PFU) 测定病毒滴度. AD-293

细胞以 1×10^5 个 / 孔铺 24 孔板, 培养 24 h 至 80%~90% 密度, 以 10 倍系列稀释病毒液, 从 10^{-2} 至

10^{-9} , 用不同稀释度的病毒液感染细胞(1 ml/孔), 37°C 孵育 3~6 h 后弃去液体培养基, 补加新鲜配制的含 10%胎牛血清、0.6% Seaplaque™ agarose 的 DMEM 胶冻状培养基继续培养 7 天. 于显微镜下计数每孔的病毒空斑数, 该数目乘以该孔的稀释倍数即为病毒的滴度(pfu/ml).

1.2.3 溶瘤病毒 Ad-HSP70p-E1A 自身以及带动复制缺陷型 AdGFP 在 A549 肺腺癌细胞中的复制. 将 4×10^4 个/孔的 A549 细胞接种到 24 孔板中, 待 24 h 贴壁培养后, 分别以 Ad-HSP70p-E1A(0.5moi)+AdGFP (10moi) 或 Ad-HSP70p-E1A (1moi)+AdGFP (10moi)或 DL309(0.5moi)+AdGFP(10moi)感染 A549 细胞, 感染 24h 后按需要分别做加热或不加热处理(加热条件: 45°C, 45 min). 待感染 48 h 和 72 h 后, 取各组细胞和上清, 反复冻融数次后, 按上述标准方法感染 AD-293 细胞做病毒空斑单位法(plaque forming unit, PFU)实验测定病毒滴度, 于 7 天后在荧光显微镜下分别计数绿色荧光蛋白表达阴性和阳性的病毒空斑数, 再分别乘以该孔的稀释倍数, 即为 Ad-HSP70p-E1A 和 AdGFP 病毒在 A549 细胞中各自的复制滴度.

1.2.4 溶瘤病毒 Ad-HSP70p-E1A 对 A549 肺腺癌的杀伤作用.

将 4×10^4 个/孔的 A549 细胞接种到 24 孔板中, 待 24 h 贴壁培养后, 分别以 AdGFP(200, 100, 50, 10, 2moi)、Ad-HSP70p-E1A(200, 100, 50, 10, 1, 0.5moi)、Ad-HSP70p-E1A (200, 100, 50, 10, 1, 0.5moi)+AdGFP(10moi)感染 A549 细胞, 感染 24 h 后按需要分别做加热或不加热处理(加热条件: 45°C, 45 min). 待培养 7 天后, 弃去培养基, 做结晶紫染色, 活细胞呈紫色, 而死细胞不被染色.

将 4×10^3 个/孔的 A549 细胞接种到 96 孔板中, 待 24 h 贴壁培养后, 分别以不同病毒剂量的 AdGFP 和 Ad-HSP70p-E1A(10000, 1000, 100, 10, 1, 0.1, 0.01moi)感染细胞, 24 h 后按需要分别做加热或不加热处理, 各设 9 个复孔. 待培养 7 天后, 按 CCK-8 assay kit 说明书在酶标仪上测定每孔 A_{450} 值, 按公式(试验组 A_{450} -96 孔板背景 A_{450}) / (未处理组 A_{450} -96 孔板背景 A_{450})计算出各处理组的细胞存活百分率. 将每种不同处理组的细胞存活率与病毒剂量梯度做线性回归分析(GraphPad Prism version 3.0 software), 计算出各种病毒处理组对 A549 肿瘤的半数致死量 LD_{50} .

1.2.5 溶瘤病毒 Ad-HSP70p-E1A 在热效应下带动 AdGFP 所携带的报告基因 GFP 的表达. 将 4×10^4 个/孔的 A549 细胞接种到 24 孔板, 待 24 h 贴壁培养后, 分别以 AdGFP(10moi)、Ad-HSP70p-E1A (0.5moi)+AdGFP (10moi)、DL309 (0.5moi)+AdGFP(10moi)感染细胞, 24 h 后按需要分别做加热或不加热处理, 之后在 24 h、48 h 不同时间点用 TRIZOL 收集各种不同处理组的细胞, 抽提总 RNA.

按 Promega 逆转录试剂盒说明各取 2 μ g 总 RNA 逆转录合成 cDNA, 再按 SYBR® Premix Ex Taq™ 取相同剂量的 cDNA 做模板, 做 GFP 和 E1A 基因的转录水平 Real-time PCR 定量测定. GFP 的上下游引物序列为: 5' AGAAGAACGGCATCAAGGTG 3' 和 5' GAACTCCAGCAGGACCATGT 3'; E1A 的上下游引物序列为: 5' TCCGGTCCTTCTAACACACC 3' 和 5' GGCGTTTACAGCTCAAGTCC 3'; 内参基因 GAPDH 的上下游引物序列为: 5' ATGGAAATCCCATCACCATCTT 3' 和 5' CGCCACTTGATTTTGG 3'. GFP 定量法如下: 按公式得到 $\Delta C(t)_{GFP}=C(t)_{GFP}-C(t)_{GAPDH}$, 再求得 $\Delta\Delta C(t)_{GFP}=\Delta C(t)_{GFP}$ -各时间点其他处理组- $\Delta C(t)_{GFP}$ -各对应时间点 AdGFP(10moi)组, 计算 $2^{-\Delta\Delta C(t)_{GFP}}$ 值就是各实验组的 GFP 表达量倍数(以各时间点 AdGFP(10moi)组的 GFP 表达量为 1). E1A 定量法如下: 按公式得到 $\Delta C(t)_{E1A}=C(t)_{E1A}-C(t)_{GAPDH}$, 计算 $2^{-\Delta\Delta C(t)_{E1A}}$ 值就是各实验组 E1A 的表达量倍数(以各实验组看家基因的表达量为 1).

1.2.6 溶瘤病毒 Ad-HSP70p-E1A 在热效应下带动 Ad-CMV-hGMCSF 和 Ad-CMV-mIL12 所携带的免疫治疗基因 hGMCSF 和 mIL12 的表达. 将 6×10^4 个/孔的 A549 细胞接种到 24 孔板, 待 24 h 贴壁培养后, 分别以不同剂量 Ad-CMV-hGMCSF(10, 50, 100moi)、Ad-HSP70p-E1A (0.5moi)+Ad-CMV-hGMCSF(10moi)、不同剂量 Ad-CMV-mIL12(0.01, 0.1, 1, 10moi)、Ad-HSP70p-E1A (1moi)+Ad-CMV-mIL12 (0.01, 0.1, 1, 10moi)、DL309 (1moi)+Ad-CMV-mIL12(0.01, 0.1, 1, 10moi)感染细胞, 各设 3 复孔, 24 h 后按需要分别做加热或不加热处理, 并弃去培养基, 换 2%胎牛血清的新鲜 DMEM 培养 24 h、48 h、72 h 后收集上清做 ELISA 测定.

1.2.7 统计学方法. 体外实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并运用 Sigmaplot 软件采用 ANOVA 法做统计学处理.

2 结 果

2.1 溶瘤病毒 Ad-HSP70p-E1A 自身以及带动复制缺陷型 AdGFP 在 A549 肺腺癌细胞中复制

A549 肺癌细胞感染溶瘤腺病毒 Ad-HSP70p-E1A 后, 72 h 时的病毒产量均高于 48 h. 另外, 在外界热诱导效应下, 每个 A549 肺癌细胞的病毒产量更高, 可提升约 2~10 倍, 表明加热能使 Ad-HSP70p-E1A 在肺腺癌 A549 细胞中更好地实现复制(图 2a).

复制缺陷型腺病毒 AdGFP 由于缺失早期基因 E1A 表达而丧失了复制能力. 然而, 将它与溶瘤病毒 Ad-HSP70p-E1A 联合应用后, 由于溶瘤病毒自身有源源不断的 E1A 基因表达, 可反式提供给复制缺陷型腺病毒, 从而也就带动了复制缺陷型腺病毒的复制, 这一推论被本实验所证实. A549 肺癌细胞联合感染溶瘤病毒 Ad-HSP70p-E1A 与 AdGFP 后, 在热效应作用下, 每个 A549 细胞产生的 AdGFP 子代病毒产量同样可提高约 2~10 倍(图 2b).

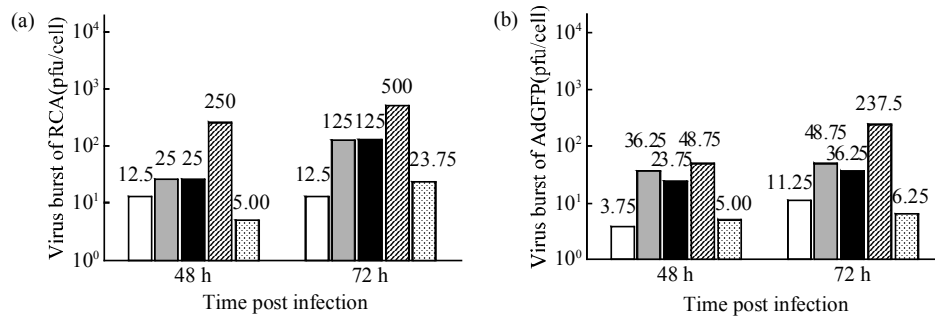


Fig. 2 Adenoviral production ability in human lung cancer cell line A549

(a)Virus production by oncolytic adenoviral vector in human lung cancer cell line A549. □: Ad-HSP70p-E1A(0.5moi); ■: Ad-HSP70p-E1A(1moi)-heated; ▨: Ad-HSP70p-E1A(1moi)-heated; ▩: DL309(0.5moi). (b)Virus production of AdGFP in A549 when combined with oncolytic adenovirus. The cells were infected with Ad-HSP70p-E1A(0.5moi)+AdGFP(10moi) or Ad-HSP70p-E1A(1moi)+AdGFP(10moi) or DL309(0.5moi)+AdGFP(10moi) and treated 24 h later at 45°C for 45 min. The viral outputs per cell were shown above each column. □: Ad-HSP70p-E1A(0.5moi)+AdGFP(10moi); ■: Ad-HSP70p-E1A(0.5moi)+AdGFP(10moi)-heated; ▨: Ad-HSP70p-E1A(1moi)+AdGFP(10moi); ▩: Ad-HSP70p-E1A(1moi)+AdGFP(10moi)-heated; ▪: DL309(1moi)+AdGFP(10moi).

2.2 溶瘤病毒 Ad-HSP70p-E1A 对 A549 肺腺癌的杀伤作用及与热效应的关系

溶瘤病毒 Ad-HSP70p-E1A 本身具有很强大的杀伤 A549 肿瘤细胞的能力, 在加热诱导效应下, 其溶瘤效应更得到进一步增强. 当 Ad-HSP70p-

E1A 用量减少到 10moi 时, 在无热诱导情况下对 A549 没有显著杀伤力, 但是一旦给予加热诱导后, 其溶瘤效应却有显著改善, 能提升 5 倍, 即与 50moi 剂量溶瘤病毒的杀伤力基本相同(图 3a).

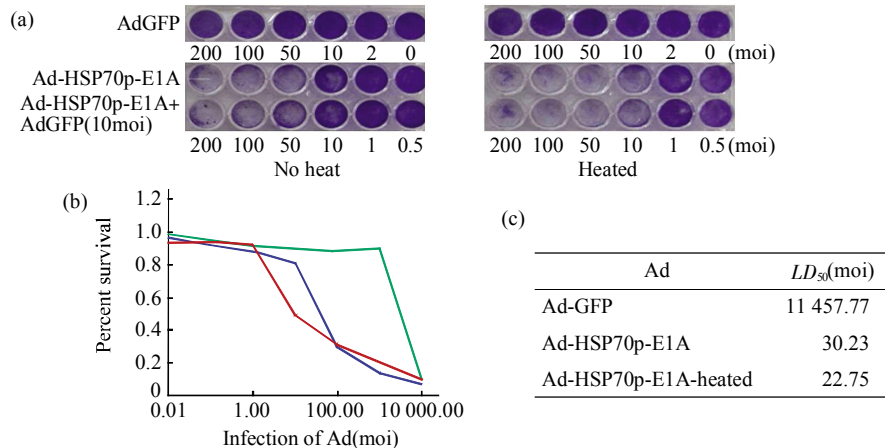


Fig. 3 Antitumor efficacy of Ad-HSP70p-E1A on human lung cancer cell line A549

(a) Oncolytic effect of Ad-HSP70p-E1A on human lung cancer cell line A549. (b) Dose response curves from a representative CCK-8 cytotoxicity experiment. Cells were infected with a dilution series of the indicated vectors. After 7 days, an CCK-8 cytotoxicity assay was performed. The viability of each infected culture is expressed as a percentage of uninfected controls. A sigmoidal dose-response curve was then fit to the data, and LD₅₀ values (c) were calculated by GraphPad Prism version 3.0 software. Each data point is the mean of nine replicate curves. —: Ad-GFP; —: Ad-HSP70p-E1A; —: Ad-HSP70p-E1A-heated.

存活曲线显示, Ad-HSP70p-E1A 的溶瘤效率在 1~100moi 剂量范围内与加热效应成正相关, 即在热诱导效应下, Ad-HSP70p-E1A 的自我复制能力得到大幅度提升, 产生更多子代病毒, 继而产生“旁观者效应”, 溶瘤效率增强, 表现为曲线显著左移, 即少量病毒联合热疗就能产生很强的溶瘤效果(图 3b).

2.3 溶瘤病毒 Ad-HSP70p-E1A 在热效应下带动 AdGFP 所携带的报告基因 GFP 表达

GFP 蛋白的定量 Real-time PCR 结果显示, 肺腺癌细胞 A549 在感染各组病毒 48 h 后, Ad-HSP70p-E1A(0.5moi)本身即可使 AdGFP 携带的 GFP 表达量提高 5.74 倍, 在热诱导效应下大幅度提升至 76.64 倍, 效果均优于野生型腺病毒 DL309 ($P < 0.0001$)(图 4a).

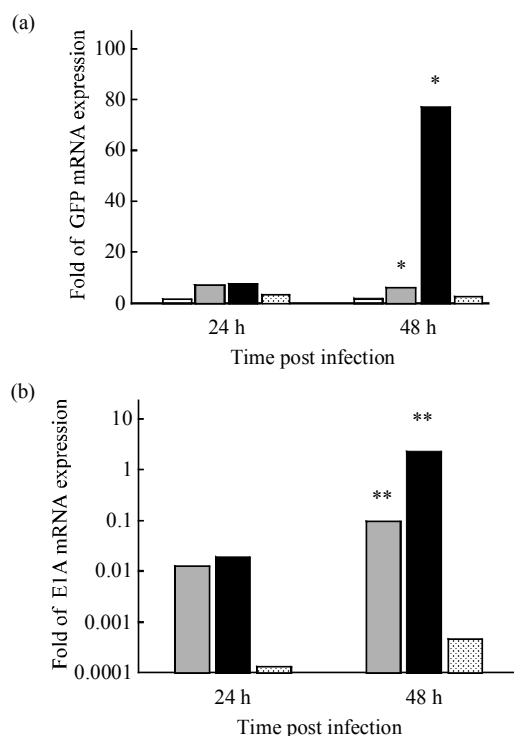


Fig. 4 The ability of Ad-HSP70p-E1A to elevate GFP expression level carried by AdGFP when coinfecting human lung cancer cell line A549

(a)The fold of green fluorescence protein delivered by AdGFP in human lung cancer cell line A549. (b)The fold of E1A mRNA expression delivered by oncolytic vectors. Cells were infected with AdGFP at the moi of 10, whether combined with oncolytic vector Ad-HSP70p-E1A or wild type adenovirus DL309 at the moi of 0.5. After 24 h later, cells were treated at 45°C for 45 min or not. Cells were extracted 24 h later or 48 h later. Real time PCR analysis was then carried out according to protocols detailed in the "Materials and methods." *, **, $P < 0.0001$. □: AdGFP (10moi); ▒: Ad-HSP70p-E1A (0.5moi)+AdGFP (10moi); ■: Ad-HSP70p-E1A (0.5moi)+AdGFP (10moi)-heated; ▓: DL309 (0.5moi)+AdGFP(10moi).

此外, 病毒复制所必需的早期基因 E1A 的表达模式与 GFP 蛋白的表达模式完全一致. 溶瘤病毒 Ad-HSP70p-E1A 感染 A549 肿瘤细胞后, 在外部热诱导效应下, 其 E1A 蛋白的表达水平显著提高, 表达量甚至超过看家基因 GAPDH, 为看家基因的 2.2 倍, 具有显著性差异($P < 0.0001$), 与 GFP 蛋白表达密切同步(图 4b).

2.4 溶瘤病毒 Ad-HSP70p-E1A 在热效应下带动 Ad-CMV-hGMCSF 和 Ad-CMV-mIL12 所携带的免疫治疗基因 hGMCSF 和 mIL12 表达

Ad-CMV-hGMCSF(10moi)与小剂量 Ad-HSP70p-E1A(0.5moi)联合感染 A549 肿瘤细胞后, 复制缺陷型腺病毒所携带的治疗基因 hGMCSF 的表达量由 1 080 ng/L 上升至 3 515 ng/L, 具有显著性差异

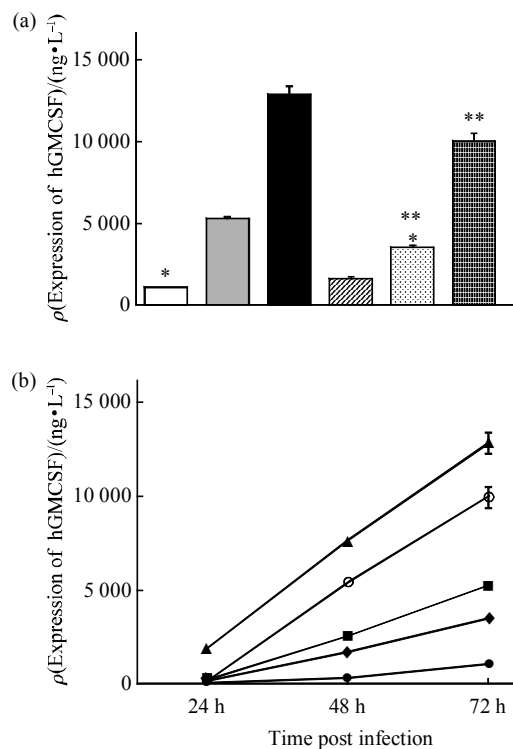


Fig. 5 The ability of Ad-HSP70p-E1A to elevate hGMCSF expression level carried by Ad-CMV-hGMCSF when coinfecting human lung cancer cell line A549

Expression of hGMCSF in human lung cancer cell line A549 72 h later (a) and three time points 24 h, 48 h, 72 h (b) measured by ELISA test Kits, after infected with replication-deficient Ad-CMV-hGMCSF whether combined with oncolytic adenovirus or not, according to protocols detailed in the "Materials and methods."*, **, $P < 0.0001$. □: Ad-CMV-hGMCSF(10moi); ▒: Ad-CMV-hGMCSF(50moi); ■: Ad-CMV-hGMCSF(100moi); ▓: DL309(0.5moi) + Ad-CMV-hGMCSF(10moi); ▔: AdHSP70p-E1A (0.5moi) +Ad-CMV-hGMCSF (10moi); ▕: AdHSP70p-E1A (0.5moi) +Ad-CMV-hGMCSF (10moi)-heated. ●—●: Ad-CMV-hGMCSF(10moi); ■—■: Ad-CMV-hGMCSF(50moi); ▲—▲: Ad-CMV-hGMCSF (100moi); ◆—◆: Ad-HSP70p-E1A (0.5moi) +Ad-CMV-hGMCSF (10moi); ○—○: Ad-HSP70p-E1A (0.5moi) +Ad-CMV-hGMCSF(10moi)-heated.

($P < 0.0001$). 在外部热诱导条件下, hGMCSF 可达 10 000 ng/L, 提升了约 3 倍, 具有统计学意义 ($P < 0.0001$), 而与单纯应用 Ad-CMV-hGMCSF (10 moi)组相比, 至少提高了 9 倍(图 5a).

不同时间点的 hGMCSF 动态检测数据显示, 不同处理组在感染 A549 细胞后, 治疗基因 hGMCSF 的表达量随时间变化呈线性升高; 其次, 联合应用组在加热诱导下, 小剂量 Ad-HSP70p-E1A(0.5moi)能显著提升 hGMCSF 的表达水平, 曲线介于 Ad-CMV-hGMCSF(50moi)组和 Ad-CMV-hGMCSF (100moi)组两者之间, 表明小剂量 Ad-HSP70p-E1A(0.5moi)能将 Ad-CMV-hGMCSF 携带的治疗基因 hGMCSF 的表达提升至 5~10 倍(图 5b).

mIL12 的 ELISA 结果显示: a. Ad-CMV-mIL12 感染 A549 肿瘤细胞后, 其 mIL12 的表达量随病毒剂量的逐步增加(0.01moi, 0.1moi, 1moi, 10moi)而增加, 加热后 mIL12 的表达量明显增加, 甚至高于

溶瘤病毒 DL309 或 Ad-HSP70p-E1A 本身的带动效率, 提示 CMV 启动子的活性在加热情况下也可被诱导. b. 虽然小剂量溶瘤病毒 Ad-HSP70p-E1A (1moi)本身能够提高 mIL12 的表达水平, 但是效率较低, 然而经加热诱导后, 其对 mIL12 表达的提升作用非常显著, 随病毒剂量的逐步增加(0.01moi, 0.1moi, 1moi, 10moi)可分别提升 121 倍, 103 倍, 22 倍和 7 倍. c. 在热诱导效应下, 溶瘤病毒 Ad-HSP70p-E1A 的带动效果远胜于野生型腺病毒 DL309. 我们对所有组间进行了 ANOVA 分析, 提示组间差异均有统计学意义(图 6).

综上所述, 各处理组治疗基因 mIL12 的表达量按由高到低的顺序依次排列为 Ad-HSP70p-E1A (1moi)+Ad-CMV-mIL12-heated 组 >> DL309(1moi)+Ad-CMV-mIL12-heated 组 > Ad-CMV-mIL12-heated 组 > Ad-HSP70p-E1A (1moi)+Ad-CMV-mIL12 组 > Ad-CMV-mIL12 组.

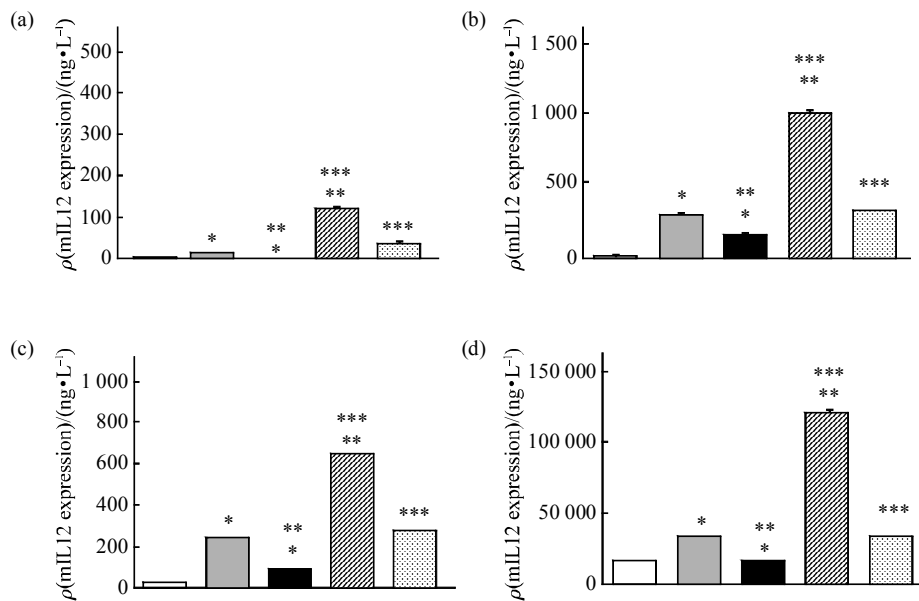


Fig. 6 The ability of Ad-HSP70p-E1A to elevate mIL12 expression level carried by Ad-CMV-mIL12 when coinfecting human lung cancer cell line A549

Expression of mIL12 in human lung cancer cell line A-549 measured by ELISA test Kits, after infected with replication-deficient Ad-CMV-mIL12 whether combined with oncolytic adenovirus or not, according to protocols detailed in the "Materials and methods". ANOVA analysis with Sigmaplot software for repeated measurement was conducted to interpret the differences between columns. (a) Ad-CMV-mIL12(0.01moi). (b) Ad-CMV-mIL12 (0.1moi). (c) Ad-CMV-mIL12(1moi). (d) Ad-CMV-mIL12(10moi). *, **, *** $P < 0.0001$. □: Ad-CMV-mIL12; ■: Ad-CMV-mIL12-heated; ■: Ad-HSP70p-E1A(1moi)+Ad-CMV-mIL12; ▨: Ad-HSP70p-E1A(1moi)+Ad-CMV-mIL12-heated; ▤: DL309(1moi)+Ad-CMV-mIL12-heated.

3 讨 论

基因治疗作为恶性肿瘤治疗的辅助治疗方法在

全世界范围内受到普遍重视并被广泛研究, 恶性肿瘤基因治疗最常用的载体是腺病毒. 过去, 出于安全性方面的考虑, 大多采用复制缺陷型腺病毒, 但

由于转导效率有限, 治疗效果不理想. 溶瘤腺病毒^[3-5](oncolytic adenovirus)作为近年来新兴的肿瘤基因治疗载体, 因具有“细胞溶解”和“旁观者效应”而备受青睐. 该新型腺病毒感染肿瘤细胞后, 能自身复制, 产生众多子代病毒; 病毒复制导致宿主肿瘤细胞死亡的同时, 释放出的子代病毒可继续感染周围的肿瘤细胞, 通过“病毒复制-细胞裂解-再感染”循环, 复制型腺病毒比通常采用的复制缺陷型腺病毒能产生更强的肿瘤杀伤作用. 但是, 必须严格将病毒的复制限制在肿瘤细胞内, 以免除病毒在正常细胞内复制所造成的损伤和随之而来的副作用. 在构建溶瘤腺病毒时, 目前最常用的手段是利用肿瘤特异性启动子调控与腺病毒复制有关的早期基因 E1A 的表达, 从而使腺病毒选择性地肿瘤细胞内复制, 进而起到选择性杀伤肿瘤细胞的作用^[6,7]. 在本实验中, 我们分离到 HSP70 基因的 5' 端调控片段来调控病毒复制所必需基因 E1A 的表达, 由此构建出的溶瘤病毒 Ad-HSP70p-E1A 在加热后, 其自身的复制能力得到大幅度提升. 另外, 还通过反式提供 E1A 蛋白, 使复制缺陷型腺病毒 AdGFP, Ad-CMV-hGMCSF 和 Ad-CMV-mIL12 也复制, 并产生子代病毒. 不仅显著提升了治疗基因的表达水平, 也提升了溶瘤作用. 由于热疗可局部使用, 且在时间和空间方面可以人为控制, 因此, 可以调控治疗基因在病变或肿瘤部位高水平表达. 此外, 我们的研究结果也显示, 未加热时 Ad-HSP70p-E1A 仅能稍微提高治疗基因的表达水平, 表明调控的严谨性也较好. 本研究结果显示, 选用 HSP70 启动子序列作为调控腺病毒实现条件性复制和溶瘤的策略是成功的, 有望在应用于体内治疗恶性肿瘤时具有较好的安全性和可控性.

热疗作为一种物理辅助治疗方法已被有效地运用到了肿瘤治疗中. 它能很好地诱导受热的肿瘤组织局部显著表达热休克蛋白家族, 包括 HSP70, HSP90, HSP96 和 HSP110. 越来越多的研究证明, 热休克蛋白家族是一类免疫调节分子, 能够携带特异性抗原呈递于细胞表面, 在激活宿主机体先天和后天获得性免疫效应方面发挥着非常重要的作用. 免疫应答的关键是抗原的加工递呈, 热休克蛋白和肿瘤细胞内蛋白酶解成的抗原短肽结合, 被运送到粗面内质网, 通过与 MHC-I 类分子结合形成热休克蛋白抗原肽复合物(HSP-antigen complex, HAC), 或通过 MHC-II 类抗原处理途径共同表达于细胞表

面, 以受体介导方式被 DC 细胞内吞后处理加工, 最终有力激活特异性抗肿瘤细胞的 CD8⁺ 或 CD4⁺ 辅助 T 细胞免疫应答效应^[2,8]. 这样, 当重组的溶瘤腺病毒 Ad-HSP70p-E1A 在热效应的作用下, 一方面自身不断地重复“感染-复制-裂解-再感染”循环, 不断地溶解杀伤肿瘤细胞, 使 MHC-I 类分子在肿瘤细胞表面表达量增加, 另一方面, 腺病毒溶瘤过程中产生大量的具有免疫原性的抗原短肽, 与热效应所诱导产生的大量热休克蛋白家族^[9]共同作用形成 HAC 表达于肿瘤细胞表面, 使肿瘤的免疫原性增强, 机体抗肿瘤细胞免疫被激活, 从而在体内还有可能杀伤远处转移的肿瘤细胞. 因此, 我们构建的热调控条件复制型腺病毒体内应用可能还可以通过免疫调控发挥更大的作用, 热疗加基因治疗有望发挥更好的治疗效果.

然而遗憾的是, 本研究难以进一步在裸鼠体内验证. 因为人的肿瘤模型只能建立在裸鼠体内, 而裸鼠存在先天免疫功能缺陷. 此外, 人的某些免疫调控基因在小鼠体内不能有效发挥作用. 因此, 下一步我们将利用小鼠肿瘤模型进行深入研究.

参 考 文 献

- 1 Keith R L, Miller Y E. Lung cancer: genetics of risk and advances in chemoprevention. *Curr Opin Pulm Med*, 2005, **11**(4): 265~271
- 2 Huang Q, Hu J K, Lohr F, *et al.* Heat-induced gene expression as a novel targeted cancer gene therapy strategy. *Cancer Res*, 2000, **60**(6): 3435~3439
- 3 Lee C T, Park K H, Yanagisawa K, *et al.* Combination therapy with conditionally replicating adenovirus and replication defective adenovirus. *Cancer Res*, 2004, **64**(18): 6660~6665
- 4 Nishimoto T, Yoshida K, Miura Y, *et al.* Oncolytic virus therapy for pancreatic cancer using the adenovirus library displaying random peptides on the fiber knob. *Gene Ther*, 2009, **16**(5): 669~680
- 5 Bortolanza S, Bunuales M, Otao I, *et al.* Treatment of pancreatic cancer with an oncolytic adenovirus expressing interleukin-12 in syrian hamsters. *Mol Ther*, 2009, **17**(4): 614~622
- 6 Alemany R, Balague C, Curiel D T. Replication-selective viruses for cancer therapy. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**(7): 723~727
- 7 Kirn D, Martuza R L, Zwiebel J. Replication-selective virotherapy for cancer: Biological principles, risk management and future direction. *Nat Med*, 2001, **7**(7): 781~787
- 8 Ren W H, Strube R, Zhang X Q, *et al.* Potent tumor-specific immunity induced by an *in vivo* heat shock protein-suicide gene-based tumor vaccine. *Cancer Res*, 2004, **64**(18):6645~6651
- 9 Liu Y, Ye T, Sun D, *et al.* Tumor-specific therapeutic effect induced by an oncolytic adenoviral vector containing heat shock protein 70 and prodrug activation genes. *Gene Ther*, 2006, **13**(16): 1235~1243

Construction and Characterization of Oncolytic Adenovirus Controlled Under Heat Shock Protein70 Gene Promoter*

WEI Fang¹⁾, WANG Hui-Ping¹⁾, CHEN Xia-Fang¹⁾, LI Chuan-Yuan²⁾, HUANG Qian^{1)**}

¹⁾ Central Laboratory, The First People's Hospital of Shanghai Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China;

²⁾ Department of Radiation Oncology, University of Colorado Health Sciences Center, Aurora, Colorado 80111, USA)

Abstract As an innovative class of promising cancer therapeutic, oncolytic adenovirus has been commonly used recently due to its ability to infect and lyse cancer cells specifically, while ideally leaving normal cells unharmed. A potential advantage of oncolytic adenoviral vectors over conventional antitumor agents is that viral replication in the tumor will amplify the input virus dose, leading to spread of the virus throughout the tumor. To observe the inhibiting effect of oncolytic adenovirus on the lung cancer cell growth in combination with hyperthermia and to determine whether it can improve the expression levels of therapeutic gene delivered by replication-deficient adenovirus, an oncolytic adenovirus named Ad-HSP70p-E1A was constructed by employing the human HSP70 gene promoter to drive the expression of adenovirus E1A gene. The experimental results show that *in vitro*, Ad-HSP70p-E1A can replicate in lung carcinoma A549 cell line and destroy those cancer cells to some extent. While combined with hyperthermia, the number of replicative virions released from lung carcinoma increased about 2~10 times and the oncolytic effect on lung carcinoma A549 cell line increased 5 times at least. In addition, when combined with oncolytic adenovirus Ad-HSP70p-E1A, replication-deficient adenoviruses such as AdGFP, Ad-CMV-hGMCSF and Ad-CMV-mIL12 at the moi of 10 are expected to lead to the expression level of therapeutic gene at higher levels. The green fluorescence protein increased 76.64 times, while cytokines GMCSF and IL12 increased 5 times and 7 times respectively.

Key words oncolytic adenovirus, HSP70 promoter, hyperthermia, gene therapy, lung cancer

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00308

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30325043, 30428015, 30500553, 30672440) and National Basic Research Program of China (2004CB518804).

**Corresponding author.

Tel: 86-21-63240090-4601, E-mail: qhuang@sjtu.edu.cn

Received: May 10, 2009 Accepted: August 5, 2009